

⑬ Int. Cl.<sup>3</sup>

A 61 K 31/395

識別記号

ABC  
ABE  
ABL

庁内整理番号

7475-4C

⑭ 公開 平成4年(1992)2月17日

C 12 P 17/18

// C 07 D 227/12

8931-4B

6701-4C

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全5頁)

⑮ 発明の名称 血管新生抑制剤

⑯ 特 願 平2-152099

⑰ 出 願 平2(1990)6月11日

⑱ 発 明 者 佐 野 浩 東京都町田市玉川学園7-19-16

⑲ 発 明 者 玉 沖 達 也 東京都町田市本町田2662-13

⑳ 発 明 者 大 村 智 東京都世田谷区瀬田5-12-7

㉑ 出 願 人 協和醗酵工業株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号

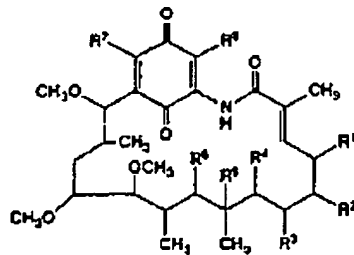
明 細 書

1. 発明の名称

血管新生抑制剤

2. 特許請求の範囲

一般式 (I)



(式中、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>はCとまたは一総になって結合を表わし、R<sup>3</sup>およびR<sup>4</sup>がCとの場合、R<sup>3</sup>とR<sup>4</sup>およびR<sup>5</sup>とR<sup>6</sup>はそれぞれ一総になって結合を表わし、R<sup>7</sup>およびR<sup>8</sup>はHを表わす。R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>が一総になって結合を表わす場合、R<sup>2</sup>はOCH<sub>3</sub>またはCとを表わし、R<sup>3</sup>はHまたはNH<img alt="arrow pointing right" data-bbox="365 865 385 885"/>を表わし、R<sup>4</sup>はHまたはBrを表わし、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>およびR<sup>8</sup>は、R<sup>7</sup>がOCONH<sub>2</sub>の

場合R<sup>5</sup>およびR<sup>6</sup>は一総になって-O-または結合を表わし、R<sup>5</sup>およびR<sup>6</sup>が一総になって-O-(O-O)-を表わす場合、R<sup>6</sup>はBrを表わす。)で表わされるヘパリン誘導体を有効成分とする血管新生抑制剤。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、血管新生抑制剤に関する。血管新生抑制剤は、血管の異常増殖によって発症する疾患、たとえばリウマチ性関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、老人性黄斑変性症、初産婦産時の遅刻産脈形成の予防または治療薬として期待される。

従来の技術

血管新生抑制作用を有する物質としては、たとえばドロキシプロゲステロン、硫酸化多糖体、牛胎骨抽出液などが知られており、またコラーゲンとヘパリンの併用によって、血管新生を抑制することができることも知られている。

ヘパリンはアンチファイブリン系抗生物質に分類される抗生物質で除菌活性、抗タバコマイクビールス活性およびP388ロイケミア、B16

メラノーマ、L1210 ロイケミア、ルイス・ラング・カルシノーマ、エーリッヒ・アザイテス・カルシノーマなどを用いたマウス実験動物系において抗癌活性を示すことが知られている。ある種のハービマイシンの誘導体がエーリッヒ・アザイテス・カルシノーマを用いたマウス実験動物系において抗癌活性を示すことが知られている [ジャーナル・オブ・アンタイバイオティクス (J. Antibiotics) 37, 1264 (1984); 39, 415 (1986)]。

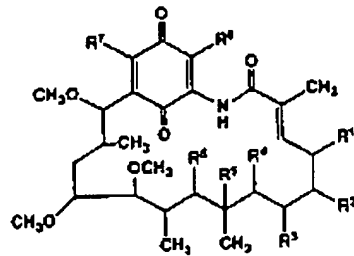
また、ハービマイシン A およびその誘導体が癌化した細胞を正常な細胞に分化させることが知られている [モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell. Bio.), 6, 2198 (1986), ジャーナル・オブ・アンタイバイオティクス (J. Antibiotics), 41, 831 (1988)]。

発明が解決しようとする課題

本発明の目的は医薬品として有用な新しい血管新生抑制剤を提供することにある。

課題を解決するための手段

本発明によれば、一般式 (1)

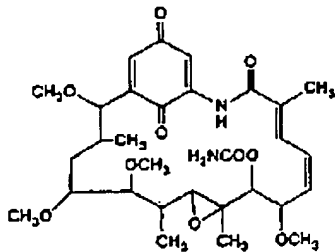


(式中、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は〔ℓまたは一輪〕になって結合を成し、R<sup>3</sup>およびR<sup>4</sup>が〔ℓの場合、R<sup>3</sup>とR<sup>4</sup>およびR<sup>5</sup>とR<sup>6</sup>はそれぞれ一輪〕になって結合を成し、R<sup>7</sup>およびR<sup>8</sup>は H を表す。R<sup>9</sup>およびR<sup>10</sup>が一輪〕になって結合を成す場合、R<sup>9</sup>は OCH<sub>3</sub> または Cℓ を表し、R<sup>11</sup>は H または NH-〔ℓ〕 を表し、R<sup>12</sup>は H または Br を表し、R<sup>13</sup>、R<sup>14</sup>およびR<sup>15</sup>は、R<sup>13</sup>が CONH<sub>2</sub> の場合 R<sup>14</sup>およびR<sup>15</sup>は一輪〕になって -n- または結合を成し、R<sup>16</sup>およびR<sup>17</sup>が一輪〕になって -G-CO-O- を表す場合、R<sup>18</sup>は Br を表す。) で表されるハービマイシン誘導体を有効成分とする血管新生抑制剤

を提供する。

以下に、化合物 (1) の具体例およびそれぞれの物性化学的性質を示す。

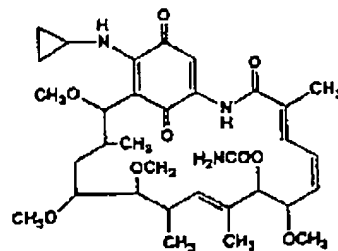
(1) 化合物 1-1



TLC Rf値: 0.5 (ベンゼン:酢酸エチル=1:1)  
 融点: 138℃  
 旋光度:  $[\alpha]_D^{25} = +126.0^\circ$  (c 0.5, CHCl<sub>3</sub>)  
 紫外線吸収スペクトル:  $\lambda_{max}^{CH_3OH} = 272(23,900)$   
 マススペクトル:  $m/z$  530(M<sup>+</sup>, C<sub>36</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>)  
 水素核磁気共鳴スペクトル(CDCℓ<sub>2</sub>, 中):  $\delta$  (ppm)  
 6.98(1H, dd, J=1.0, 11.5Hz), 6.59(1H, dd, J=2.0, 2.0Hz), 6.46(1H, dd, J=11.5, 11.5Hz), 5.80(1H, dd, J=11.5, 11.5Hz), 4.56(1H, d, J=

11.5Hz), 4.17(1H, s), 2.96(1H, d, J=9.0Hz), 1.33(3H, t)

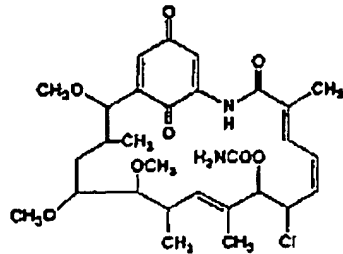
(2) 化合物 1-2



TLC Rf値: 0.60 (ベンゼン:酢酸エチル=1:1)  
 旋光度:  $[\alpha]_D^{25} = -130.0^\circ$  (c 0.2, CHCl<sub>3</sub>)  
 紫外線吸収スペクトル:  $\lambda_{max}^{CH_3OH} = 245(32,000)$   
 マススペクトル:  $m/z$  629(M<sup>+</sup>, C<sub>36</sub>H<sub>41</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>)  
 水素核磁気共鳴スペクトル(CDCℓ<sub>2</sub>, 中):  $\delta$  (ppm)  
 7.60(1H, brd), 6.48(1H, s), 4.48(1H, brs)

特開平 4-46120 (3)

(3) 化合物 1-3



TLC Rf値: 0.69 (ベンゼン:アセトン=7:3)

融点: 123℃ (分解)

旋光度:  $[\alpha]_D^{25} = +54^\circ$  (c 0.5, CHCl<sub>3</sub>)

紫外線吸収スペクトル:  $\lambda_{max}^{CH_2OH}$  nm( $\epsilon$ ) 232(18,500)

高分解能マススペクトル: m/e 578, 239

(C<sub>29</sub>H<sub>39</sub>O<sub>7</sub>Cl<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>としての計算値 578.239)

水素核磁気共鳴スペクトル(CDCl<sub>3</sub>中):

$\delta$  (ppm) 7.23(1H, d, J=2.3Hz), 6.60(1H, dd, J=2.3, 3.0Hz), 5.99(1H, dd, J=7.6, 1.6Hz), 5.80(1H, brs), 5.51(1H, qd, J=1.0, 7.1Hz), 5.10(1H, brd, J=7.6Hz), 4.50(1H, d, J=3.0 Hz), 1.66(3H, d, J=1.1Hz)

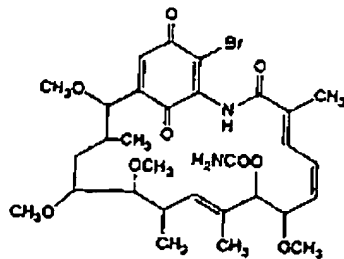
J=2.7, 10.6Hz), 4.66(1H, dd, J=2.7, 9.8Hz), 1.75(3H, d, J=1.3Hz)

元素分析: C 60.26, H 6.98, N 2.45, Cl 12.89

(C<sub>28</sub>H<sub>37</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>としての計算値:

C 60.74, H 6.74, N 2.53, Cl 12.64

(5) 化合物 1-5



TLC Rf値: 0.45 (ベンゼン:アセトン=7:3)

融点: 178℃ (分解)

旋光度:  $[\alpha]_D^{25} = +93^\circ$  (c 0.5, CHCl<sub>3</sub>)

紫外線吸収スペクトル:  $\lambda_{max}^{CH_2OH}$  nm( $\epsilon$ ) 258(18,600)

水素核磁気共鳴スペクトル(CDCl<sub>3</sub>中):

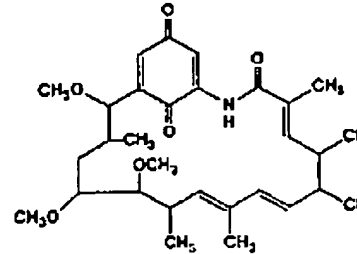
$\delta$  (ppm) 6.92(1H, d, J=0.9Hz), 6.42(1H, qd, J=1.1, 11.5Hz), 6.32(1H, dd, J=11.5,

元素分析: C 60.01, H 6.92, N 4.71, Cl 5.89

(C<sub>29</sub>H<sub>39</sub>Cl<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>としての計算値:

C 60.18, H 6.80, N 4.84, Cl 6.05

(4) 化合物 1-4



TLC Rf値: 0.89 (ベンゼン:アセトン=7:3)

融点: 199℃ (分解)

旋光度:  $[\alpha]_D^{25} = +99^\circ$  (c 0.5, CHCl<sub>3</sub>)

紫外線吸収スペクトル:  $\lambda_{max}^{CH_2OH}$  nm( $\epsilon$ ) 271(23,500)

高分解能マススペクトル: m/e 553, 200

(C<sub>28</sub>H<sub>37</sub>Cl<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>としての計算値 553.200)

水素核磁気共鳴スペクトル(CDCl<sub>3</sub>中):

$\delta$  (ppm) 7.33(1H, d, J=2.5Hz), 6.63(1H, dd, J=2.0, 2.5Hz), 6.55(1H, d, J=13.5Hz), 5.86(1H, dd, J=9.8, 13.5Hz), 4.99(1H, dd,

12.5Hz), 5.30(1H, dd, J=10.6, 11.5Hz),

5.28(1H, qd, J=1.0, 9.8Hz), 5.03(1H, d,

J=3.4Hz), 4.49(1H, dd, J=6.9Hz), 4.00

(1H, dd, J=9.1, 10.6Hz), 3.18(1H, dd,

J=1.8, 10.0Hz), 2.25(1H, m), 1.26(3H, d,

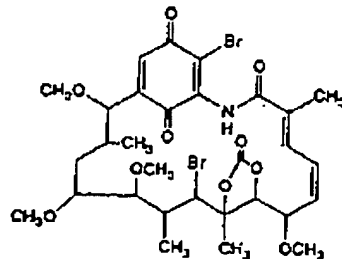
J=1.0Hz)

元素分析: C 54.89, H 6.32, N 4.26, Br 12.68

(C<sub>28</sub>H<sub>37</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>としての計算値:

C 55.24, H 6.34, N 4.29, Br 12.10

(6) 化合物 1-6



TLC Rf値: 0.84 (ベンゼン:アセトン=7:3)

融点: 132℃ (分解)

旋光度:  $[\alpha]_D^{25} = -83^\circ$  (c 0.5, CHCl<sub>3</sub>)

紫外線吸収スペクトル :  $\lambda_{max} = 268 (12,000)$

水素核磁気共鳴スペクトル (COC# 中) :

$\delta$  (ppm) 7.28 (1H, qd, J=1, 2, 12.2Hz), 6.81 (1H, d, J=1.5Hz), 4.61 (1H, d, J=7.3Hz), 4.4? (1H, s), 4.32 (1H, d, J=9.4Hz), 2.32 (1H, m), 1.83 (3H, s)

元素分析 : C 48.97, H 5.31, N 1.93, Br 21.69

$C_{10}H_{12}BrNO_2$  としての計算値 :

C 49.24, H 5.38, N 1.92, Br 21.16

化合物 1-1 および 1-2 は特開昭 63-218620 号公報に、化合物 1-3 ~ 1-6 はジャーナル・オブ・アンチバイオティクス (J Antibiotics) 39, 415 (1986) にそれぞれ製造法とともに記載されている公知物質である。

化合物 (1) は投与の目的および方法により、常法により調製された錠剤、顆粒剤、粉剤、カプセル剤、シロップ剤、軟膏剤、クリーム剤、注射剤などの形で投与することができる。とくに注射剤の形で用いるのが好ましい。注射剤として用いる場合、生理食塩水、ブドウ糖、ラクトース、マ

ネシト注射剤に適切な界面活性剤たとえば Tween®

80 を助剤として加えそこに化合物 (1) を懸濁させ、これを 1~1000mg/kg、1日 1~3回で患部内あるいは局所に投与する。

化合物 (1) は血管新生作用を有し、ハービマイン A と比較して低毒性である。また化合物の一部はハービマイン A が示すような既存の血管に対する作用がないことから、血管の異常増殖によって発症する様々な疾患たとえば、リウマチ性関節炎、糖尿病性網膜症、末期癌腫瘍症、老人性黄斑部症、創傷治癒時の過剰創傷形成などに有用である。次に化合物 (1) の毒性および薬理作用について、試験例で説明する。

試験例 1

急性毒性試験

6 週齢、雄の DDY マウス (25 ± 1g、1群 3匹) に、2% のアラビアガムを含む生理食塩水に懸濁した試験化合物を腹腔内に投与し、24 時間後の生存率から 50% 生存投与量 (LD<sub>50</sub>) を上げ下げ法で算出した結果、化合物 (1) はいず

れも LD<sub>50</sub> : > 2000 mg/kg であった。

試験例 2

鶏受精卵の鶏尿膜内の血管新生に対する抑制作用

エヌ・タナカらの方法 [Experimental Pathology] 39, 147 (1986) に従い、鶏受精卵の鶏尿膜内の血管新生に対する化合物 (1) の作用を調べた。

10 ~ 20 個の 4.5 日齢の鶏の受精卵に小穴を開け、鶏尿膜上に酢酸ビニル-エチレン共重合体 (EV40 : 三井化学工業製) に封入した試験化合物を貼付し、3日後で 2 日間鶏卵殻内で培養後、10% のブドウ糖液 (イントラリポス (intralipos) : ミドリヤ社製) 1cc を鶏尿膜内に注入し、鶏尿膜内に新生される血管に対する試験化合物の抑制作用の程度を観察した。

すなわち、血管形成の認められない領域が 3mm 以上の卵卵を完全抑制を示した卵卵とし、抑制率を次式で算出した。

$$\text{抑制率 (\%)} = \frac{\text{完全抑制を示した卵卵の数 (個)}}{\text{全卵卵数 (個)}} \times 100$$

またフィッシャー (Fischer) の正確確立法により p 値を求めた。いずれのデータも p 値は 0.05 以下であった。

その結果を第 1 表に示す。第 1 表に示したように、本発明の化合物は、0.01 ~ 1.0 mg/個の投与で、有意な血管新生抑制作用が認められた。

試験例 3

既存の血管に対する作用試験

10 日目の卵卵を用いて試験例 2 と同様にして試験化合物を設置、培養し、鶏尿膜内にすでに形成されている血管に対する作用を調べた。既存の血管の消失が観察されるものを、変化がないものを - として第 2 表に示す。

表 1

化合物	投与量 (mg/個)	抑制率 (%)	既存血管に 対する作用
I-1	0.1	12	+
	1	100	
	10	100	
I-2	0.01	20	+
	0.1	50	
	1	80	
	10	100	
I-3	0.1	12	+
	1	50	
	10	100	
I-4	0.1	12	+
	1	65	
	10	100	
I-5	0.01	10	-
	0.1	30	
	1	35	
	10	30	
I-6	0.01	10	-
	0.1	30	
	1	30	
	10	30	
ハービマイ シンA	0.01	0	+
	0.1	50	
	1	100	

以下に本発明を実施例で示す。

実施例 注射剤

化合物(I-1)の200gをエタノール20Lに溶解した後、ミリポアフィルター(孔径0.22μ)で加圧ろ過して無菌化をこなす。得られる無菌ろ液5.0mlを褐色バイアルに分注し、常圧により凍結乾燥し、50mg/バイアルの凍結乾燥剤を得る。

発明の効果

本発明により、医薬品として有用な新しい血管新生抑制剤が提供される。

特許出願人(102) 協和発酵工業株式会社

代表者 加藤 保夫

